Aus der I. Inneren Abteilung des Städtischen Krankenhauses
Berlin-Neukölln
(Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. K. Holldack)
und
aus dem Institut für Haematologie der GSF, Assoziation mit
EURATOM München
(Leiter: Prof. Dr. W. Stich)

DIE WIRKUNG VON CHLORAMBUCIL AUF DIE PROLIFERATION VON MENSCHLICHEM KNOCHENMARK IN VITRO

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Klaus Baenisch
aus Hohenlockstedt

1974

Aus der I. Inneren Abteilung des Städtischen Krankenhauses
Berlin-Neukölln
(Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. K. Holldack)
und
aus dem Institut für Haematologie der GSF, Assoziation mit
EURATOM München
(Leiter: Prof. Dr. W. Stich)

DIE WIRKUNG VON CHLORAMBUCIL AUF DIE PROLIFERATION VON MENSCHLICHEM KNOCHENMARK IN VITRO

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Klaus Baenisch
aus Hohenlockstedt

Referent: Frau Professor Dr. I. Boll

Korreferent: Herr Professor Dr. H. Brücher

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Promoviert am: 17. September 1974

Druck: Der Präsident der Freien Universität Berlin – Zentrale Universitätsdruckerei V aA 4, 1 Berlin 41

Gewidmet

meinen Eltern

Dr. med. Horst Baenisch

Ingborg Baenisch, geb. Scholle

Digitized by the Internet Archive
in 2026

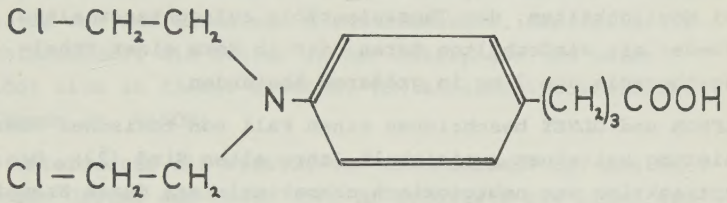
https://archive.org/details/IA41546512_0082

Gliederung

	Seite
Einleitung	7
Material und Methode	12
Ergebnisse	18
Zusammenstellung der Ergebnisse	54
Diskussion	58
Zusammenfassung	61
Literaturverzeichnis	63

Einleitung

Chlorambucil ist ein Stickstofflostderivat und wurde von den Engländern EVERETT, ROBERTS und ROSS entwickelt (6). Es handelt sich chemisch um p-(Di-2-chloräthylamino)-phenylbuttersäure.



HADDOW beschrieb 1952 die deutliche wachstumshemmende Wirkung von Chlorambucil auf das transplantierte Walker-Sarkom 256 bei Ratten (11). Das Präparat wirkt durch Alkylierung von Nukleinsäureuntereinheiten entsprechend den pharmakologischen Eigenschaften der Stickstofflostverbindungen (12).

Die Hauptindikationen sind die malignen Lymphome wie die chronische lymphatische Leukämie, die Lymphogranulomatose, das Lymphosarkom, das Retikulumzellsarkom und die Waldenströmsche Makroglobulinämie. Aber auch beim Mamma- und Ovarialkarzinom erzielte man teilweise gute Behandlungsergebnisse (8,15). Besonders bei der Behandlung der lymphatischen Leukämie gehört Chloambucil zu den zur Zeit besten Präparaten (21). Es ist sehr gut verträglich und erzielt bei peroraler Zufuhr Remissionen in 60 - 80 % der Fälle. Wiederholte Kuren konnten ohne Gefahr der toxischen Nebenwirkung durchgeführt werden. Lediglich eine zunehmende Knochenmarkdepression wurde als wesentliche toxische Wirkung beschrieben (7).

Chlorambucil ist per os wirksam. Die mittlere Dosierung bei lymphatischer Leukämie beträgt 0,2 mg/kg KG täglich in einmaliger Gabe 3 - 6 Wochen lang, bis die Leukozytenzahl auf 15 000 - 20 000/mm^3 gesunken ist (7).

Der Therapieeffekt zeigt sich meist nach der dritten Woche in einer langsam fortschreitenden Leukopenie (17). Bei zu hoher Dosierung (max. 6,5 mg/kg KG) muß mit einer irreversiblen Knochenmarkschädigung gerechnet werden. Die meisten Patienten sprechen jedoch auf niedrige Dosen von Chlorambucil gut an. Die Nebenwirkungen bei therapeutischen Dosen beschränken sich auf Übelkeit und Erbrechen (9). Es gibt zwei Möglichkeiten, den Therapieerfolg aufrechtzuerhalten: entweder mit wiederholten Kuren oder in Form einer Erhaltungstherapie von 2 mg in größeren Abständen.

WOLFSON und OLNEY beschrieben einen Fall von toxischer Überdosierung bei einem zweieinhalb Jahre alten Kind (22). Die Hauptreaktion war neurotoxisch, charakterisiert durch Krampfanfälle und einem komatösen Zustand, der aber nur relativ kurze Zeit anhielt. Leukozyten und Lymphozyten waren zeitlich während der ersten 27 Tage vermindert. Knochenmarkschädigungen wurden nicht festgestellt. Auch die Nieren- und Leberfunktion blieben ungestört.

VAN PUTTEN verglich die Wirkung verschiedener zytostatischer Substanzen, darunter auch Chlorambucil, auf die Zellproliferation und die Tumorreduktion (18). Chlorambucil hemmt die Zellproliferation und bewirkt eine Tumorreduktion. Jedoch sind andere Substanzen stärker wirksam.

LAWLER untersuchte mit einem einfachen in vitro-Test die Wirkung von Chlorambucil auf die Lymphozyten (13). Er benutzte dabei peripheres Blut von Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie und normales Blut von Gesunden. Nachdem Granulozyten und Monozyten entfernt waren, beurteilte man die Wirkung von Chlorambucil nach dem Grad des Zelltodes der Lymphozyten im Vergleich zur indifferenten Kontrolle. Die Kulturen wurden für 120 Std. bei 37° C incubiert. Teilweise wurden drei verschiedene Konzentrationen von Chlorambucil hinzugesetzt (0,5; 0,7; 1,0 µg/ml). Das normale Blut zeigte unterschiedliches Verhalten. Bei den einen deutliche Sensibilität der Lymphozyten gegenüber Chlorambucil, bei anderen nur ein mäßiger Effekt.

Auch das Blut der Leukämiekranken ergab unterschiedliche Ergebnisse. Waren die Lymphozyten empfindlich, so nahm der Zelltod auch bei höheren Dosen entsprechend zu. Auffallend war, daß die Patienten mit resistenten Lymphozyten meist sehr hohe Blutlymphozytenwerte aufwiesen, während die Patienten mit empfindlichen Lymphozyten sowohl hohe als auch niedrige Blutwerte hatten. Eine Beziehung zwischen Wirkung und Alter der Patienten war nicht erkennbar. Zweifellos tötet Chlorambucil die Zellen in der Interphase und unterscheidet sich in dieser Hinsicht von anderen zytostatischen Substanzen (s. ELSON).

ELSON untersuchte die Wirkung von Chlorambucil auf die blutbildenden Organe der Ratte (5). Er arbeitete mit einer einmaligen sublethalen Dosis von 12,5 mg/kg KG. Makroskopisch zeigte sich zwischen dem ersten und zweiten Tag eine stärkere Rötung und leichte Verflüssigung der Knochenmarkkonsistenz. Eine Zunahme der Fettzellen blieb aber aus.

Unter dem Einfluß von Chlorambucil nahm die Anzahl der blutbildenden Zellen rapide ab.

Von 24 bis 48 Stunden nahmen die reifen Erythroblasten relativ zu, wobei viele stark gelappte Kerne und acidophiles Cytoplasma hatten. Ferner traten häufig anormale Mitosen der Erythroblasten auf. Die Wirkung hatte nach 48 Stunden ihr Maximum. Gleichzeitig zeigte sich auch eine Verminderung der Retikulozyten im peripheren Blut bis zum völligen Verschwinden am 3. und 4. Tag. Danach folgte eine schnelle Regeneration bis zum 6. Tag. Die Retikulozyten stiegen in ihrer Anzahl schnell wieder an, so daß am 8. - 10. Tag sogar eine Überhöhung der Werte eintrat.

Megakaryozyten erwiesen sich als sehr resistent gegenüber Chlorambucil.

In der Granulopoese nahmen bei der Ratte die reifen Granulozyten und unreifen Granuloblasten rapide ab, mit gleichzeitig relativ vermehrtem Auftreten von Hypersegmentierten. Auch zelluläre und mitotische Abnormitäten wurden häufiger.

Am 5. Tag waren alle Segmentkernigen hypersegmentiert. Nach 48 Stunden begann wieder eine schnelle Regeneration, die am 10. Tag das doppelte der Normalwerte erreichte.

In bezug auf die lymphatischen Organe zeigte sich nach 32 Stunden ein Substanzverlust der Milz, des Thymus, der Lymphknoten und der Peyerschen Plaques. Zwischen der 6. und 18. Stunde nach der Injektion betrug die Anzahl der Lymphozyten im Knochenmark nur noch 35 % der Kontrolltiere, und nur 2 % blieben nach 48 Stunden übrig. Die Blutlymphozyten verminderten sich nach 72 Stunden bis auf 10 % des Anfangswertes. Die Regeneration war sehr langsam, und auch am 20. Tag nach der Injektion waren die normalen Werte noch nicht erreicht.

Wie diese Versuche zeigen, kommt Chlorambucil in bezug auf die Erythro- und Granulopoese schnell zur Wirkung. Diese hält aber nur kurz an, und durch früh einsetzende Regeneration wird der alte Zustand bald wieder hergestellt, anders beim lymphatischen Gewebe, bei dem man eine schnell eintretende, intensive und lang andauernde Wirkung gefunden hat.

Es wird vermutet, daß Clorambucil die Zellen nur während einer kurzen Phase des Generationszyklus angreift, und zwar von der synthetischen Periode bis zur Vollendung der Teilung. Die große Anzahl mitotischer Abnormalitäten sind ein Zeichen dafür, daß sich teilende Zellen die Mitose nicht regulär beenden können. Sie sterben und werden von Makrophagen beseitigt. Zellen, deren Entwicklung bis zur letzten Mitose beendet ist, scheinen keinen Schaden zu erleiden. Sie reifen normal und gehen ins periphere Blut über. Die in die synthetische Phase eintretenden Zellen durchlaufen diese normal, sind dann aber unfähig, sich zu teilen.

Chlorambucil schädigt also nur die Zellen des Knochenmarks, die sich in dem verwundbaren Stadium des Generationszyklus befinden. Die eindrucksvolle Wirkung auf das lymphatische Gewebe kann hingegen nicht allein darauf beruhen. Die Phago-

zytose von Zelltrümmern schon 6 Stunden nach der Injektion von Chlorambucil läßt auf eine Schädigung auch der reifen Lymphozyten schließen.

Die in der Einleitung beschriebenen Versuche von ELSON an Ratten in vivo sollen an humanem Knochenmark in vitro wiederholt werden. Benutzt wurde dazu ein Kulturverfahren nach CARREL mit Modifikation nach Boll (3). In der Koagulumkultur haben wir zwar nur einen Beobachtungszeitraum von 3 bis 4 Tagen, können aber die direkte Einwirkung des Chlorambucil auf die Kinetik prüfen unter Ausschluß humoraler und nervaler Einflüsse des Organismus. In Anlehnung an ELSON wählten wir die Dosis 20y/ml als Zusatz zur Kultur. Die Auswertung der Proliferationsaktivität während drei Tagen erfolgt anhand von Mitose-Indices, G/E-Indices, Reifungskurven und karyologischen Kurven.

Es wurden Knochenmarkkulturen von fünf Patienten angefertigt, von denen drei an Leukämie litten und zwei normales Knochenmark aufwiesen. Es soll dabei die direkte Wirkung von Chlorambucil auf leukämisches und nichtleukämisches Knochenmark verglichen werden.

Material und Methode

Das durch Sternalpunktion gewonnene Knochenmark wurde nach der CARRELschen Methode mit Modifikation nach BOLL in Kulturen angelegt (3).

Die Kulturmischung bestand bei den Fällen 1 und 4 zu 10 % aus dem Wuchsstoff Carhormon^{R}, dreifach verstärkt, zu 30 % aus Fremdserum, zu 50 % aus Eigenplasma und zu 10 % aus Chlorambucillösung. Bei Fall 2 wurde statt Eigenplasma Fremdplasma, bei den Fällen 3 und 5 statt Fremdserum Eigenserum benutzt.

Nach Koagulation des Tropfens dieser Mischung auf einem hohlgeschliffenen Objektträger wird ein Bröckel Knochenmark aufgebracht und mit einem kleinen Tröpfchen Serum gegen Austrocknung geschützt. Die Knochenmarkkultur wird mit Paraffin verschlossen und bei 37^{o} C in einem Brutschrank bebrütet.

In Anlehnung an ELSON wählten wir die Dosis von 20y/ml als Zusatz zur Kultur.

Die Chlorambucillösung wurde wie folgt hergestellt:
2 Vol % Natriumcitrat und 45 % Propylenglycol wurden unter sterilen Bedingungen mit aqua bidest ad 100 Vol % aufgefüllt. 20 mg Chlorambucil wurden in einem Gefäß mit 0,5 ml Alkohol absolutus geschüttelt und mit 4,5 ml der obigen Lösung aufgefüllt.

20 mg / 5 ml	
4 mg / 1 ml	1:20 verdünnt mit Citratlsg.
0,2 mg / 1 ml	Ansatz 1:10
20 y / 1 ml	Endkonzentration

Es wurden jeweils eine Kultur mit Chlorambucil als Zusatz und eine ohne Zusatz zur Kontrolle angefertigt.

Die Kulturen der Fälle, 1, 2, 3 und 5 wurden jeweils 24, 48 und 72 Stunden, die des Falles 4 bis 48 Stunden bebrütet. Die Ausstriche wurden nach den entsprechenden Bebrütungszeiten angefertigt und an der Luft getrocknet. Die

Färbung erfolgte mit Lösungen nach MAY-GRÜNWALD und GIEMSA nach PAPPENHEIM (18). Von jedem Patienten wurde außerdem ein Originalausstrich des Knochenmarkpunktates angefertigt. Damit ergeben sich pro Patient 7 Präparate bzw. bei Patient 4 fünf Präparate.

Die Ausstriche wurden mäanderförmig ausgezählt, wobei die Anzahl der gezählten Zellen möglichst 2 000 nicht unterschreiten sollte.

68 798 Zellen wurden insgesamt differenziert und gezählt. Die Bestimmung der Zellen erfolgte nach den von BOLL (3) sowie BOLL und MERSCH (4) angegebenen Kriterien:

Rote Reihe (in Klammern die verwendeten Abkürzungen):

1. Proerythroblast (Pb)
2. basophiler Erythroblast (bE)
3. polychromatischer Erythroblast (PE)
4. oxyphiler Erythroblast (oE)
5. reifer Erythroblast (rE)

Die Zellen 1 - 4 wurden als teilungsfähig angesehen.

Weiße Reihe:

1. Myeloblast (Mb)
2. Promyelozyt (P)
3. neutrophiler Myelozyt (nM)
4. eosinophiler Myelozyt (eM)
5. basophiler Myelozyt (bM)
6. Metamyelozyt (MM)
7. Promonozyt o. Monoblast (Mob)
8. stabkerniger Granulozyt (St)
9. neutrophiler segmentkerniger Granulozyt (nS)
10. eosinophiler segmentkerniger Granulozyt (eS)
11. basophiler segmentkerniger Granulozyt (bS)
12. Monozyt (Moz)

Mitosefähig wurden die Zellen 1 - 7 angesehen.

Weiterhin wurden gezählt:
große Retikulumzellen
kleine Retikulumzellen
phagozytierende Retikulumzellen
Plasmoblasten
Plasmazellen
Megakaryoblasten
Megakaryozyten
Lymphoblasten
Lymphozyten

Die Mitosephasen wurden nach folgenden Kriterien eingeteilt (3):

1. Prophase: Auflösung der Kernmembran, keine Nucleoli, festes Spirem
2. frühe Metaphase: Verteilung der Chromosomen über die gesamte Zelle, lockeres Spirem
3. späte Metaphase: Monaster oder Äquatorialplatte
4. Anaphase: Diaster
5. Telophase: Einschnürung des Zellplasmas, lockeres Spirem
6. Rekonstruktionsphase: zwei Zellen mit festem Spirem, fadenförmige Plasmabrücke zwischen beiden Zellen

Kerndegenerationszeichen waren:

1. Pyknose
2. Homogenisierung
3. Auflockerung = Kernlyse
4. Karyorhexis = Zerfall des Kernes mit vorheriger Lappung = "Gänseblümchen"-Kerne

Zur Auswertung des Zellmaterials wurde folgendes herangezogen:

1. roter Mitoseindex (rMI):
   angegeben in ‰, egibt sich aus dem Quotienten der sich teilenden durch die teilungsfähigen Zellen der Erythropoese. Er ist somit ein Maß für die Teilungshäufigkeit der roten Zellen;
2. weißer Mitoseindex (wMI):
   angegeben in ‰, ergibt sich aus dem Quotienten der sich teilenden durch die teilungsfähigen Zellen der Granulopoese. Er ist somit ein Maß für die Teilungshäufigkeit der weißen Zellen;
3. G/E-Index:
   bestimmt durch den Quotienten aller granulopoetischer Zellen dividiert durch die Gesamtzahl aller Erythroblasten. Er zeigt Änderungen im Verhältnis von der Granulo-

poese zur Erythropoese an. Bei deutlicher Depression der roten Reihe steigt der G/E-Index an, bei deutlicher Depression der weißen Reihe fällt der G/E-Index ab.

4. Reifungskurven:
   veranschaulichen die prozentuale Verteilung der einzelnen Zellarten von Erythropoese und Granulopoese nach den jeweiligen Bebrütungszeiten;
5. karyologische Kurven:
   zeigen die absolute Verteilung der einzelnen Mitosestadien;
6. Signifikanzberechnung:
   Sie sagt aus, ob zwischen den Werten der Kontrolle und den Werten bei Zusatz von Chlorambucil nach gleichlanger Inkubationszeit ein nichtsignifikanter, signifikanter oder hoch signifikanter Unterschied besteht.

   Zur Berechnung wurde das χ^2-Verfahren angewendet (1, 2, 14, 20). Die Formel hierfür lautet:

$$\chi^2 = \sum \left[\frac{(B_K - E_K)^2}{E_K} \right] + \sum \left[\frac{(B_Z - E_Z)^2}{E_Z} \right]$$

Dabei bedeutet:

B_K: Beobachtungswert der Kontrolle
E_K: Erwartungswert der Kontrolle
B_Z: Beobachtungswert der Zusatzgruppe
E_Z: Erwartungswert der Zusatzgruppe

Das Signifikanzniveau wurde mit P:0,01 gewählt.

Es war naheliegend, sowohl einen Versuch mit normalem als auch mit chronisch myeloischem Knochenmark nach dem x^2-Verfahren auf Signifikanz zu berechnen. Es wurden dazu die Fälle 2 und 3 ausgewählt, da bei ihnen aus dem Verlauf der Reifungskurven nur eine relativ geringere Abwei-

chung zwischen Kontrolle und Zusatz gegenüber Fall 1 bzw. Fall 4 ersichtlich war. Ergibt die Berechnung hier eine Signifikanz, so sind die Kurven mit größerer Abweichung zwangsläufig auch signifikant.

Ergebnisse

An folgenden fünf Patienten wurde die Wirkung von Chlorambucil in vitro auf deren Knochenmark untersucht:

Fall 1

Patient Herrmann K. (5166), geb. 29. 7. 06
Diagnose: chron. Niereninsuffizienz bei stummer Niere re. und Ausgußstein, Pyelonephritis li.
Linksherzinsuffizienz bei Mitralinsuffizienz mit Leberstauung, Ascitesbildung und Verdacht auf Oesophagusvarizen bei chron. Emphysembronchitis. Altersdiabetes mellitus. Verdacht auf tox. Adenom. Retrosternale Struma, Oesophagusdivertikel und Knochenmetastasen in der re. Tibia

Sternalpunktion am 16. 3. 70 wegen Verdachts auf Plasmocytom
Knochenmarkdiagnose: etwa normales Knochenmark

Therapie eine Woche vor KM-Punktion:
Herzglykoside
Antidiabetika
Antibiotika
Diuretika

Blutbild vom 3. 3. 70:

Leukozyten	12 000/mm^3
Eosinophile Granulozyten	2 %
Segmentkernige Granulozyten	76 %
Lymphozyten	14 %
Monozyten	8 %

Blutbild vom 10. 2. 70:

Erythrozyten	4,2 Mill./mm^3	Basophile Granulozyten	1 %
Hb	12,6 g %	Eosinophile Granulozyten	2 %
HbE	29,8 pg	Stabkernige Granulozyten	2 %
Leukozyten	8 600/mm^3	Segmentkernige Granulozyten	83 %
		Lymphozyten	10 %
		Monozyten	2 %

Fall 2

Patientin Charlotte R. (5165), geb. 16. 10. 02
Diagnose: dekompensierte Leberzirrhose
Oesophagusvarizen
periphere Durchblutungsstörungen
Sternalpunktion am 16. 3. 70 wegen Verdacht auf chron. Myelose
Knochenmarkdiagnose: etwa normales KM

Therapie eine Woche vor KM-Punktion:
Diuretica
Herzglykoside
Antibiotika
Complamin

Blutbild vom 15. 3. 70:

Erythroc.	5,32 Mill./mm^3
Hb	17,6 g %
HbE	33 pg
Leuk.	14 800/mm^3
Eos.	2 %
St	12 %
Seg	72 %
Lym	14 %

Fall 3

Patientin Hilde N. (5236), geb. 11. 5. 08
Diagnose: beginnende chronische Myelose

Sternalpunktion am 7. 7. 70
Knochenmarkdiagnose: chron. myeloische Leukämie

Therapie: keine

Blutbild vom 7. 7. 70:

Erythroc.	4,07 Mill./mm^3
Hb	13,0 g %
HbE	31,8 pg
Leuk.	20 000/mm^3
Bas.	1 %
Eos.	1 %
Prom.	1 %
Mc.	1 %
St	6 %
Seg.	69 %
Mono	1 %
Lym.	9 %
Retz.	1 %

Fall 4

Patient Herbert S. (5164), geb. 25. 2. 35
Diagnose: chron. myeloische Leukämie

Sternalpunktion am 17. 3. 70
Knochenmarkdiagnose: chron. myeloische Leukämie

Therapie eine Woche vor KM-Punktion:
Myleran 2 mg
Cyloric
Sedativum
Neuroleptikum
Eisenpräp.

Blutbild vom 17. 3. 70

Erythroc.	2,86 Mill/mm^3
Hb	8,1 g %
HbE	28,2 pg
Leuk.	446 000/mm^3
Thromb.	222 000/mm^3
Bas.	2 %
Eos.	5 %
Mb	1 %
Mc	5 %
Meta	9 %
St	16 %
Seg	20 %
Lym.	1 %
Prom.	41 %
(pE	4)

Fall 5

Patientin Hildegard R. (5383), geb. 10. 7. 28
Diagnose: Monoblastenleukämie

Sternalpunktion am 8. 3. 71
Knochenmarkdiagnose: akute Monoblastenleukämie

Therapie eine Woche vor KM-Punktion:
Sedativum
Kortison

Blutbild vom 6. 3. 71

Erythroc.	3,2 Mill/mm^3
Hb	10,2 g %
HbE	32 pg
Leuk.	75 000/mm^3
Monobl.	88 %
Prom.	5 %
St	2 %
Seg	5 %
pE	(+)

In den Kulturpräparaten zeigten sich vermehrt strukturelle Veränderungen der Zellen nach Zusatz von Chlorambucil.

In der Erythropoese trat Karyorhexis in Form von Gänseblümchenkernen bei den reifen Erythroblasten auf als Folge einer offensichtlich toxischen Schädigung des Zellstoffwechsels. In der Granulopoese kamen teilweise abnorme Kernformen und Übersegmentierungen vor. Eine verstärkte Vakuolisierung des Plasmas war vor allem in den unreifen Formen der Granulopoese auffällig. Auch einige pathologische Mitosen kamen vor.

Die Zellen wurden nach den oben genannten Kriterien ausgewertet. Die Zählergebnisse der Zusatzpräparate wurden mit denen der Kontrollpräparate verglichen, um somit Rückschlüsse auf die spezifische Wirkung von Chlorambucil in der Erythro- und Granulopoese zu ziehen.

Der bei der Beurteilung der Reifungskurven gebrauchte Begriff , Linksverschiebung ist nur beschreibend und bedeutet nicht "Linksverschiebung" nach ROHR (19).

Fall 1

Normales Knochenmark

1. Mitose-Indices (Tab. 1 u. 7)
   In der Erythropoese und der Granulopoese wirkt Chlorambucil von 24 bis 72 h stark mitosehemmend.

2. Reifungskurve der Erythropoese (Abb. 1a)
   Nach 24 h ist durch den Zusatz von 2Oy/ml Chlorambucil die Kurve nach rechts verschoben, d. h. Zunahme der polychromatischen Erythrozyten und Abnahme der reifen Erythrozyten. Nach 48 und 72 h zeigt sich dann unter der Wirkung von Chlorambucil eine Linksverschiebung. Die teilungsfähigen Zellen sind also ab 48 h vermindert, während die reifen E. wahrscheinlich durch Verminderung der Regeneration im Vordergrund stehen.

3. Reifungskurve der Granulopoese (Abb. 1b)
   Von 24 bis 72 h fällt eine deutliche Linksverschiebung auf. Nach 24 h gehen durch die verminderten Mitosen die teilungsfähigen prozentual nicht herauf. Besonders die Segmentkernigen nehmen laufend zu, während die Promyelozyten und Myelozyten immer stärker vermindert sind. Auffallend ist das Verschwinden der eos. Myelozyten nach 24 h und der eos. Segmentkernigen nach 48 h!

4. G/E-Indices (Tab. 7)
   Nach 24 und 48 h zeigt sich durch Chlorambucil eine Depression der Granulopoese. Nach 72 h ist dann eine Depression der Erythropoese auffällig.

Tab. 1: Pat. Herrmann K. (5166) normales KM

Prozentuale Zellverteilung in der Erythropoese

	24 h		48 h		72 h	
	K	Z	K	Z	K	Z
Pb	0,7	0,7	0,4	-	-	-
bE	2,1	2,3	2,3	1,3	0,3	-
pE	36,7	72,6	24,4	14,6	12,2	9,0
oE	4,9	3,9	7,0	4,9	3,9	3,0
rE	55,6	20,5	65,9	79,2	83,6	88,0

Prozentuale Zellverteilung in der Granulopoese

Mb	1,0	1,1	0,6	0,1	0,2	-
P	19,0	7,8	7,0	4,0	3,7	0,7
nM	36,2	33,1	30,5	21,6	19,8	12,0
eM	3,9	4,2	2,6	0,7	3,4	0,5
bM	-	-	0,1	-	-	-
Mob	-	0,3	0,6	0,3	0,3	0,2
MM	13,9	13,8	13,2	10,0	11,6	6,9
St	5,6	2,9	5,6	3,7	3,5	3,5
nS	16,1	30,1	33,5	57,8	44,0	75,4
eS	4,0	5,0	5,0	1,2	12,2	0,4
bS	-	0,9	0,1	-	0,3	-
Moz	0,3	0,8	1,2	0,6	1,0	0,5

Mitosen in ‰

	M_K	M_Z		M_K	M_Z
rMI 24	$\frac{1}{254} = 3,9$	$\frac{0}{489} = 0$	wMI 48	$\frac{3}{760} = 3,9$	$\frac{1}{500} = 2,0$
wMI 24	$\frac{3}{1076} = 2,8$	$\frac{1}{804} = 1,2$	rMI 72	$\frac{0}{111} = 0$	$\frac{0}{32} = 0$
rMI 48	$\frac{0}{177} = 0$	$\frac{1}{129} = 0$	wMI 72	$\frac{1}{464} = 2,2$	$\frac{0}{340} = 0$

Zeichenerklärung: K = Kontrolle
Z = Zusatz

M_K = Mitosen in Kontrollkultur
M_Z = Mitosen in Zusatzkultur

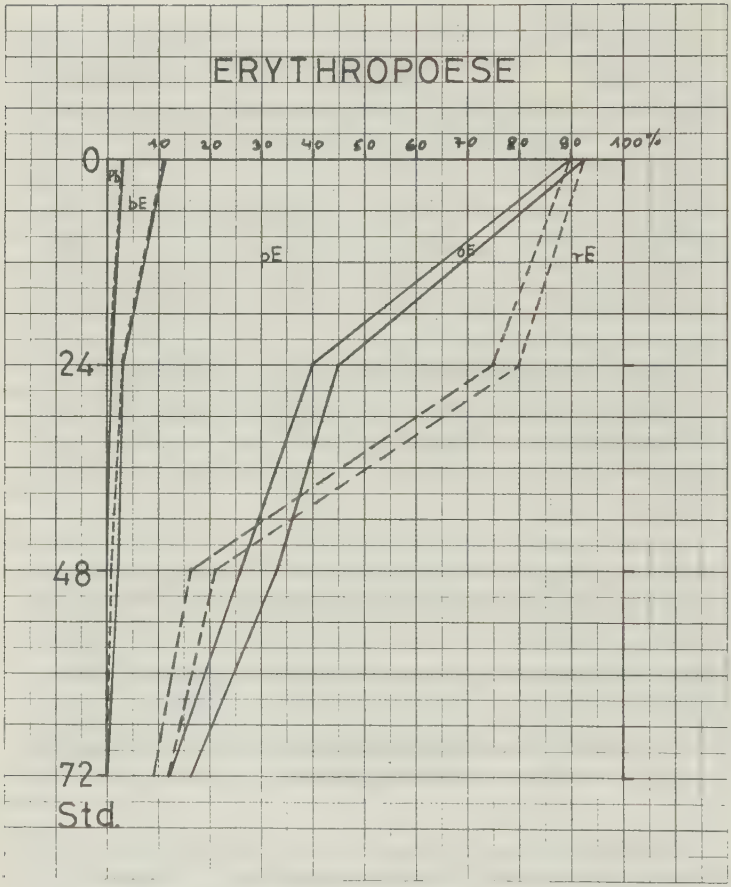


Abb. 1a Reifungskurven, Herrmann K.)

Abszisse: prozentualer Anteil der einzelnen Reifungsstufen der Erythropoese, addierend aufgetragen. Dabei beträgt Gesamtzellbestand der Erythropoese = 100 % (planimetrische Darstellung).

Ordinate: Inkubationszeit der Kulturen in Stunden

Zeichenerklärung siehe S. 14

Zusatz ---------- Kontrolle ——————

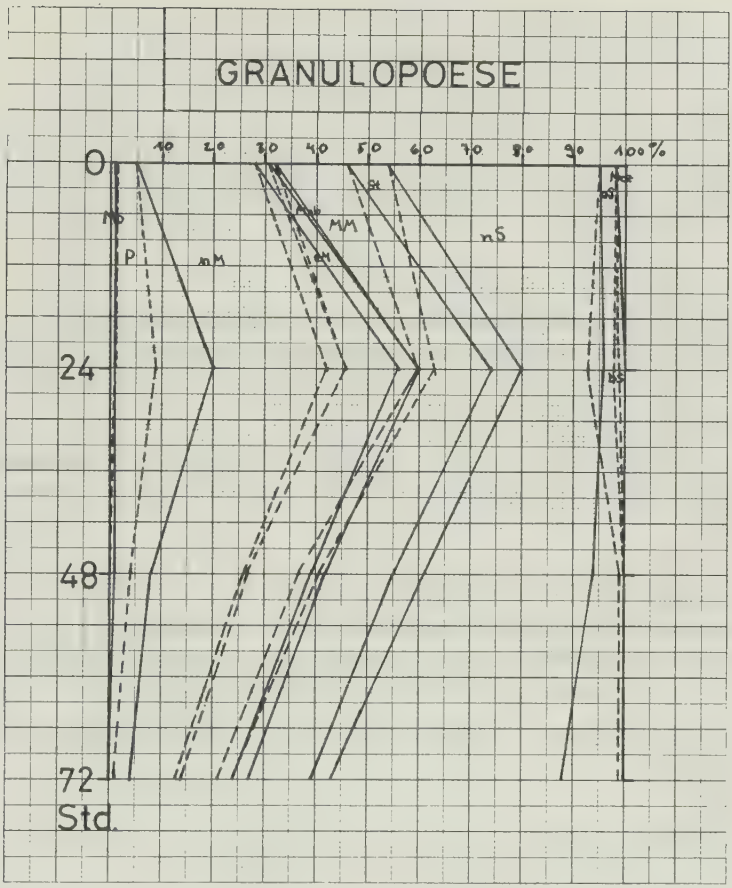


Abb. 1b: Reifungskurven, Herrmann K.

Abszisse: prozentualer Anteil der einzelnen Reifungsstufen der Granulopoese, addierend aufgetragen. Dabei beträgt Gesamtzellbestand der Granulopoese = 100 % (planimetrische Darstellung)
Ordinate: Inkubationszeit der Kulturen in Stunden

Zeichenerklärung siehe S. 14

Zusatz ---------- Kontrolle ——————

Fall 2

Normales Knochenmark

1. Mitose-Indices (Tab. 2 u. 7)
   Auffallend ist eine gravierende Abnahme der Mitosen schon nach 24 h in der roten als auch der weißen Reihe, die bis 72 h fortdauert.

2. Reifungskurve der Erythropoese (Abb. 2a)
   Durch Zusatz von Chlorambucil fällt nach 24 und 48 h eine deutliche Verschiebung der Kurven nach links auf. Die reifen Formen nehmen zu und die unreifen ab, entsprechend der verminderten Regeneration.

   Die Verhältnisse nach 72 h sind nicht beurteilbar, da das Kontrollpräparat wegen technischer Fehler nicht brauchbar ist.

3. Reifungskurve der Granulopoese (Abb. 2b)
   Auch hier nach 24 und 48 h eine durch Chlorambucil bewirkte Verminderung der Myelozyten und Jugendlichen sowie eine Zunahme vor allem der Segmentkernigen.

   Das 72 h-Präparat ist wegen technischer Fehler nicht auszuwerten.

4. G/E-Indices (Tab. 7)
   Nach 24 und 48 h kein deutlicher Unterschied.

Tab. 2: Pat. Charlotte R. (5165) normales KM

Prozentuale Zellverteilung in der Erythropoese

	24 h		48 h		72 h	
	K	Z	K	Z	K	Z
Pb	0,3	0,5	0,4	0,3	(-)	-
bE	0,7	1,0	0,6	-	(0,6)	0,2
pE	36,2	36,3	17,7	17,5	(17,7)	7,1
oE	15,0	8,9	12,4	8,5	(5,0)	4,4
rE	47,8	53,3	68,9	73,7	(76,7)	88,3

Prozentuale Zellverteilung in der Granulopoese

Mb	1,5	1,4	1,5	0,3	(1,2)	0,3
P	20,2	17,7	9,7	11,7	(26,2)	6,1
nM	45,0	17,5	34,6	29,4	(66,8)	44,7
eM	1,2	1,2	4,6	2,0	(2,4)	3,2
bM	-	0,2	0,1	-	(0,1)	0,2
Mob	0,3	0,6	0,7	0,2	-	-
MM	13,6	16,4	14,2	5,1	(1,7)	6,1
St	2,2	3,6	1,1	0,8	-	0,6
nS	14,2	37,8	31,7	48,2	(1,4)	36,7
eS	1,1	2,5	1,4	1,8	-	1,8
bS	0,1	-	-	-	-	-
Moz	0,6	1,1	0,4	0,5	(0,2)	0,3

Mitosen in %o

	M_K	M_Z		M_K	M_Z
rMI 24	$\frac{3}{313} = 9,6$	$\frac{0}{269} = 0$	wMI 48	$\frac{4}{473} = 8,5$	$\frac{1}{592} = 1,7$
wMI 24	$\frac{12}{946} = 12,7$	$\frac{2}{646} = 3,1$	rMI 72	$(\frac{1}{234}) = 4,3$	$\frac{0}{154} = 0$
rMI 48	$\frac{1}{153} = 6,5$	$\frac{0}{204} = 0$	wMI 72	$(\frac{2}{833}) = 2,4$	$\frac{0}{415} = 0$

Die in ( ) gesetzten Zahlen sind wegen technischer Fehler nicht auswertbar.
Zeichenerklärung siehe Tab. 1

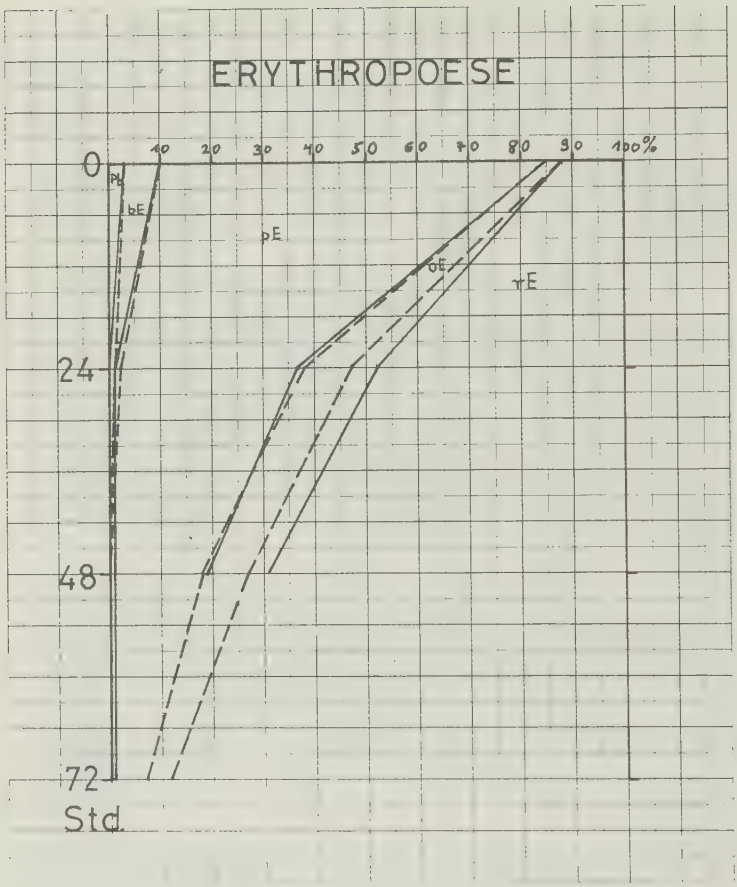


Abb. 2a Reifungskurven, Charlotte R.

Zusatz ---------- Kontrolle ——————

Zeichenerklärung siehe Abb. 1a und 1b

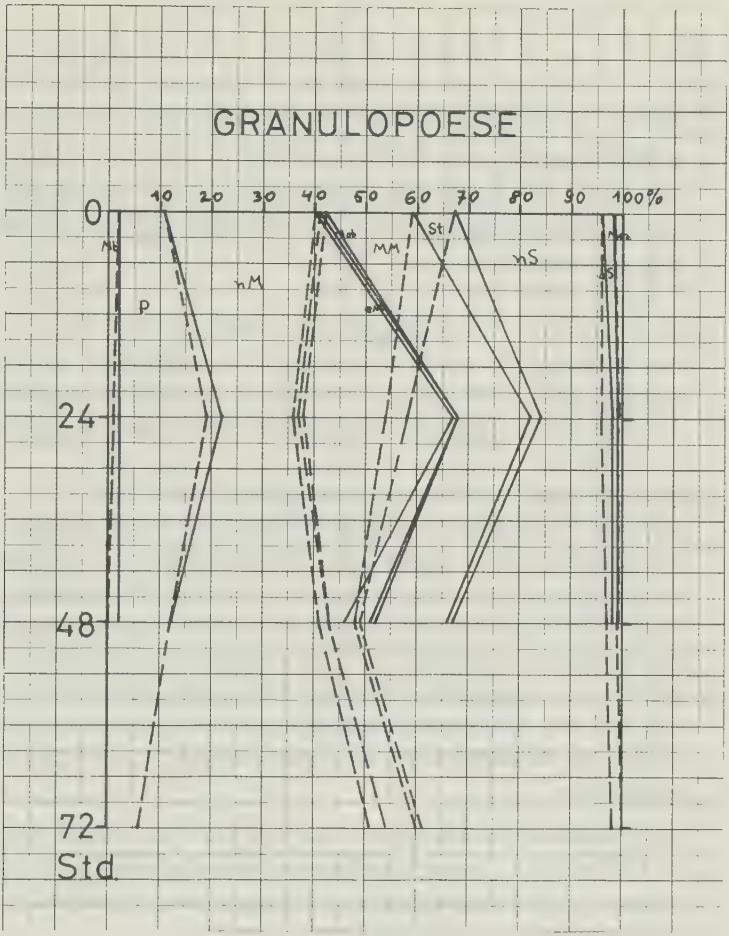


Abb. 2b Reifungskurven, Charlotte R.

Zusatz ---------- Kontrolle ——————

Zeichenerklärung siehe Abb. 1a und 1b

Fall 3

Beginnende chronische myeloische Leukämie

1. Mitose-Indices (Tab. 3 u. 7)
   Sowohl in der roten als auch in der weißen Reihe ist eine starke mitosehemmende Wirkung nach Zusatz von Chlorambucil zu verzeichnen.

2. Reifungskurve der Erythropoese (Abb. 3a)
   Von 24 bis 72 h ist die Zusatzkurve auffallend nach links verschoben. Die teilungsfähigen Zellen nehmen laufend ab, während die reifen Erythroblasten immer mehr überwiegen.

3. Reifungskurve der Granulopoese (Abb. 3b)
   Nach 24 h nehmen die Myeloblasten und Promyelozyten im Zusatzpräparat nicht zu wie in der Kontrolle, bedingt durch die verminderte Regeneration. Die Anzahl der Myelozyten und Metamyelozyten wird größer, während die Segmentkernigen abnehmen. Ob die Zunahme der Segmentkernigen in der Kontrolle hier auf einem Zufall beruht oder mit der bei der chronischen Myelose verlängerten Lebensdauer der Segmentkernigen zusammenhängt, läßt sich nicht beurteilen.

   Eine Linksverschiebung der Kurven wird erst nach 48 und 72 h sichtbar. Durch die Wirkung von Chlorambucil überwiegen jetzt die Segmentkernigen, und die unreifen Formen sind stark vermindert.

3a. Ein Basophilen-Schub nach 48 h findet sich in der Kontrolle als auch bei Zusatz. Unter der Wirkung von Chlorambucil ist er aber wesentlich stärker.

3b. Auffallend ist eine Vermehrung der Megakaryozyten in den 24, 48, 72 h-Zusatzpräparaten und 48, 72 h-Kontrollpräparaten. Es handelte sich um große wie auch kleine Formen, teils einkernig, teils mehrkernig.

4. G/E-Indices (Tab. 7)

Nach 24 h ergibt sich eine geringe Depression der Leukopoese. Wegen schlechten Ausstriches kann der 48 h-Kontroll-G/E-Indices nicht zur Beurteilung verwendet werden.

Nach 72 h liegt eine Depression der Erythropoese vor.

Tab. 3: Pat. Hilde N. (5236) Beginn. chron. Myelose

Prozentuale Zellverteilung in der Erythropoese

	24 h		48 h		72 h	
	K	Z	K	Z	K	Z
Pb	2,2	0,5	-	-	-	-
bE	4,4	2,0	-	0,8	-	-
pE	84,8	66,7	59,2	41,2	27,7	7,8
oE	1,1	2,0	3,0	3,8	2,9	2,0
rE	7,5	28,8	37,8	54,2	69,4	90,2

Prozentuale Zellverteilung in der Granulopoese

Mb	5,0	1,7	0,3	0,7	0,1	0,4
P	13,9	9,6	22,7	8,8	4,2	2,1
nM	13,4	20,3	21,7	12,9	41,2	12,0
eM	1,5	2,8	10,6	7,0	7,8	4,9
bM	-	-	0,8	1,0	-	-
Mob	0,3	0,6	0,6	0,1	0,1	-
MM	7,3	14,8	13,0	9,2	20,2	3,4
St	3,0	5,3	4,8	2,5	2,6	2,1
nS	53,2	39,8	18,0	46,1	20,9	68,9
eS	1,4	3,7	3,7	4,6	2,2	5,8
bS	-	-	1,8	6,8	-	-
Moz	1,0	1,4	1,0	0,3	0,7	0,4

Mitosen in ‰

	M_K	M_Z		M_K	M_Z
rMI 24	$\frac{3}{171} = 17,6$	$\frac{0}{139} = 0$	wMI 48	$\frac{4}{868} = 4,6$	$\frac{1}{707} = 1,4$
wMI 24	$\frac{8}{791} = 10,1$	$\frac{2}{949} = 2,1$	rMI 72	$\frac{0}{106} = 0$	$\frac{0}{30} = 0$
rMI 48	$\frac{1}{412} = 2,4$	$\frac{0}{121} = 0$	wMI 72	$\frac{3}{1118} = 2,7$	$\frac{0}{388} = 0$

Zeichenerklärung siehe Tab. 1

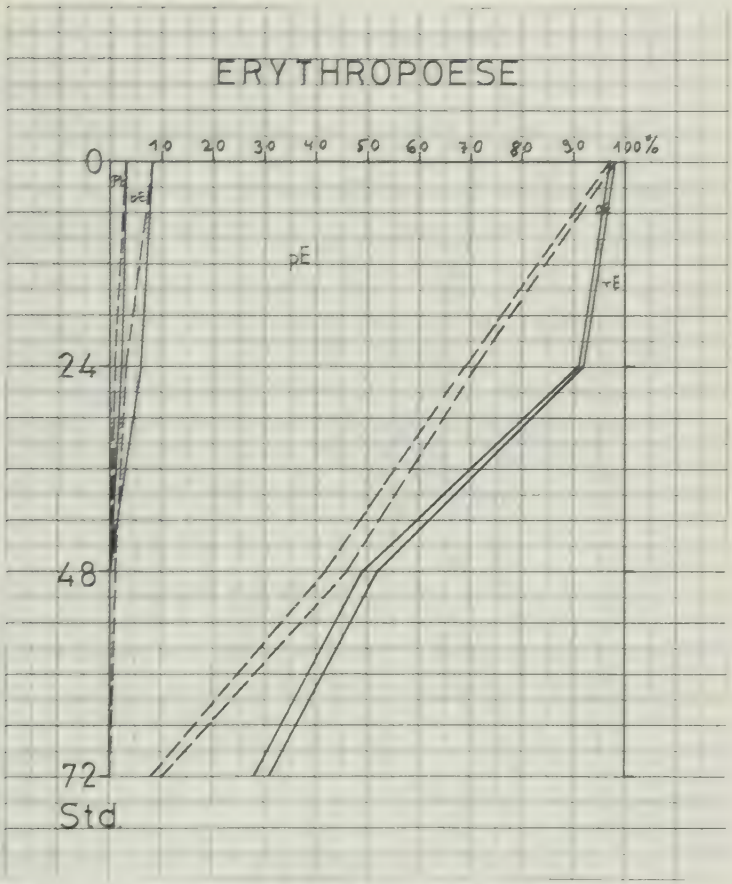


Abb. 3a Reifungskurven, Hilde N.

Zusatz ---------- Kontrolle ——————

Zeichenerklärung siehe Abb. 1a und 1b

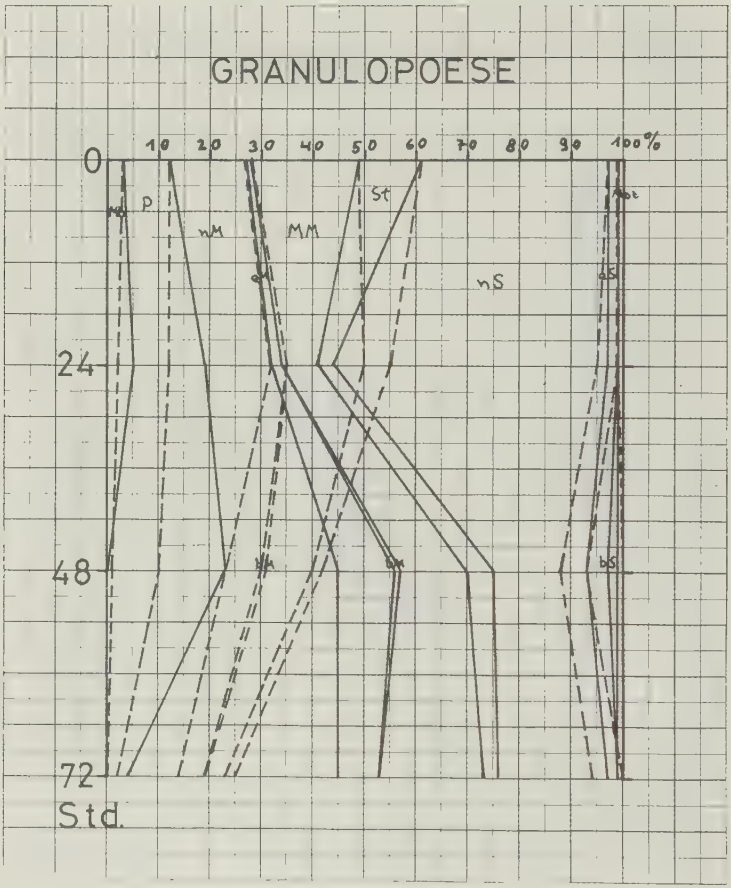


Abb. 3b Reifungskurven, Hilde N.

Zusatz ---------- Kontrolle ——————

Zeichenerklärung siehe Abb. 1a und 1b

Fall 4

Behandelte chronische myeloische Leukämie

1. Mitose-Indices (Tab. 4 u. 7)
   In der roten Reihe sind aufgrund der niedrigen Zellzahl die Mitose-Indices nicht zu verwerten.
   Dafür findet sich in der Granulopoese eine offensichtlich durch Chlorambucil bewirkte Verminderung der Mitosen.

2. Reifungskurve der Erythropoese (Abb. 4a, sehr wenige Zellen)
   Nach 24 h zeigt sich durch Zusatz von Chlorambucil eine deutliche Linksverschiebung aufgrund der Verminderung der unreifen und Zunahme der reifen Formen. Nach 48 h ist die Wirkung aufgehoben: Zusatz und Kontrolle sind fast identisch.

3. Reifungskurve der Granulopoese (Abb. 4b)
   Im Zusatzpräparat zeigt sich nach 24 h eine Abnahme der Myeloblasten und eine fehlende Vermehrung der Promyelozyten, aber eine verstärkte Vermehrung der Myelozyten mit gleichzeitiger Verminderung der Jugendlichen und Segmentkernigen.

   Nach 48 h haben wir durch die Wirkung des Chlorambucils eine deutliche Linksverschiebung, was sich in einer Zunahme vor allem der Segmentkernigen und Abnahme der Promyelozyten sowie Myelozyten manifestiert.

   Interessant ist die starke Vermehrung der Megakaryozyten in dem Kontrollpräparat von 24 h und dem Zusatzpräparat von 48 h wie in Fall 3.

4. G/E-Indices (Tab. 7)
   Chlorambucil bewirkt nach 24 und 48 h eine deutliche Depression der Granulopoese bei gleichzeitiger scheinbarer Aktivierung der ERythropoese.

Tab. 4: Pat. Herbert S. (5164) chron. Myelose

Prozentuale Zellverteilung in der Erythropoese

	24 h		48 h	
	K	Z	K	Z
Pb	-	-	-	-
bE	-	-	-	-
pB	33,3	22,2	16,7	17,6
oE	5,5	-	-	-
rE	61,2	77,8	83,3	82,4

Prozentuale Zellverteilung in der Granulopoese

Mb	0,7	0,5	0,2	0,3
P	37,0	26,6	11,7	3,5
nM	43,9	65,4	47,3	51,8
eM	2,7	0,3	2,4	2,5
bM	0,2	0,2	0,2	-
Mob	1,3	0,7	0,4	0,3
MM	5,7	2,8	21,8	14,3
St	0,5	0,7	1,0	2,5
nS	5,1	1,5	13,2	23,8
eS	0,2	-	0,3	0,2
bS	-	-	-	-
Moz	2,7	1,3	1,5	0,8

Mitosen in‰

	M_K	M_Z
rMI 24	$\frac{0}{7} = 0$	$\frac{0}{6} = 0$
wMI 24	$\frac{12}{1747} = 6,8$	$\frac{3}{1739} = 1,7$
rMI 48	$\frac{0}{2} = 0$	$\frac{0}{3} = 0$
wMI 48	$\frac{21}{1558} = 13,5$	$\frac{2}{1054} = 1,9$

Zeichenerklärung siehe Tab. 1

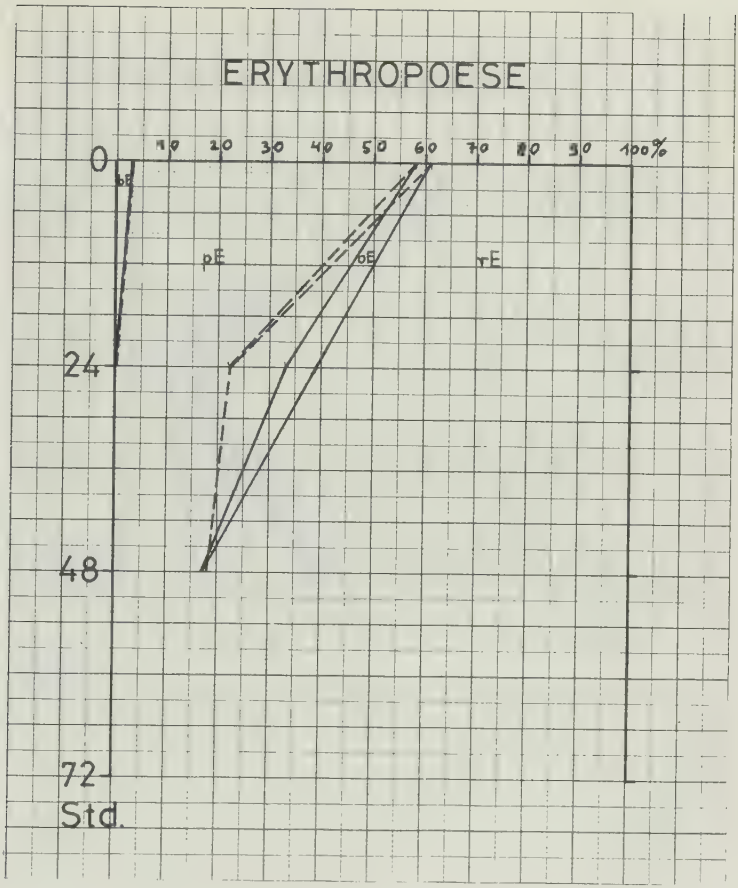


Abb. 4a Reifungskurven, Herbert S.

Zusatz ---------- Kontrolle ——————

Zeichenerklärung siehe Abb. 1a und 1b

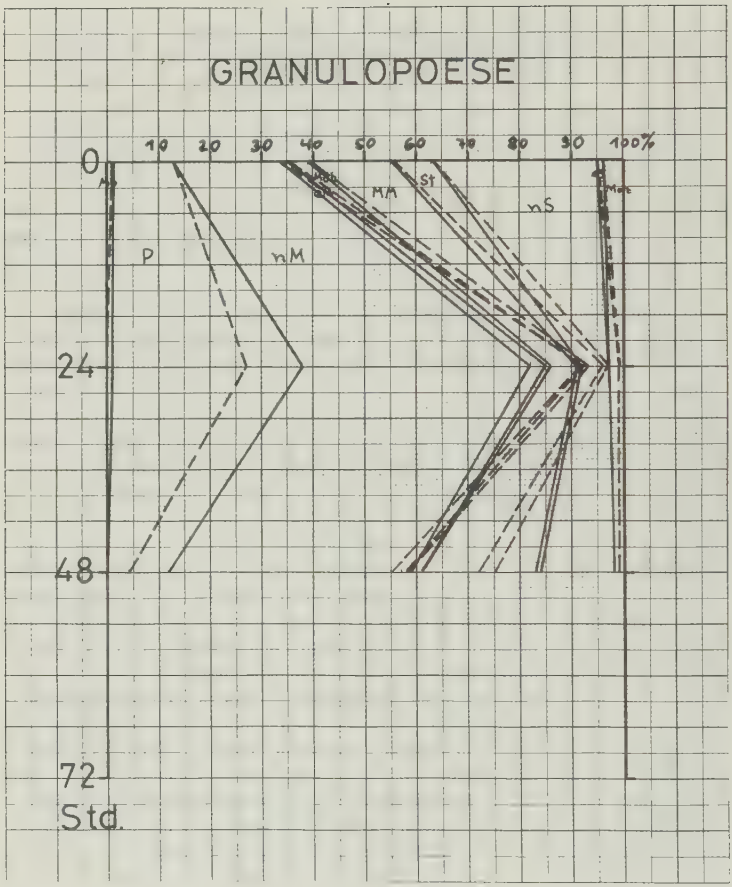


Abb. 4b Reifungskurven, Herbert S.

Zusatz ---------- Kontrolle ——————

Zeichenerklärung siehe Abb. 1a und 1b

Fall 5

Akute Monoblastenleukämie, unbehandelt

1. Mitose-Indices (Tab. 5 u. 7)
   In der Erythropoese waren in allen Präparaten wenig Erythroblasten und keine Mitosen vorhanden. Deutliche Hemmung der Mitosen zeigt in diesem Fall die Monopoese.

2. Reifungskurve der Erythropoese (Abb. 5a)
   Die Zusatzkurven sind von 24 bis 72 h deutlich nach links verschoben. Proerythroblasten und basophile E. sind nach 48 h Bebrütung mit Chlorambucil nicht mehr vertreten.

3. Reifungskurve der monoblastischen Granulopoese (Abb. 5b)
   Nach 24 h findet sich kein wesentlicher Unterschied. Von 48 bis 72 h nehmen die reifen Formen wie Monozyten und auch Segmentkernige zu, während die Monoblasten, Myelozyten und Promyelozyten sichtbar vermindert worden sind.

4. G/E-Indices (Tab. 7)
   Chlorambucil wirkt hier von 24 bis 72 h stärker destruierend auf die Monopoese.

Tab. 5: Pat. Hildegard R. (5383) Akute Monoblastenleuk.

Prozentuale Zellverteilung in der Erythropoese

	24 h		48 h		72 h	
	K	Z	K	Z	K	Z
Pb	5,9	-	-	-	-	-
bE	14,7	3,5	4,5	-	-	-
pE	73,5	45,2	68,2	33,3	24,4	17,9
oE	-	3,5	4,5	8,2	4,5	3,2
rE	5,9	47,8	22,8	58,5	71,1	78,9

Prozentuale Zellverteilung in der Granulopese

Mb	0,8	0,7	0,2	0,2	-	0,2
P	1,1	1,5	0,5	0,9	0,1	0,3
nM	2,4	4,7	1,1	1,3	0,4	1,0
eM	-	-	-	-	-	-
bM	-	-	-	-	-	-
Mob	84,3	82,8	86,0	77,0	66,2	46,9
MM	0,3	0,6	0,3	0,1	0,1	0,8
nS	0,2	1,2	0,2	2,3	1,0	3,5
eS	-	-	-	-	-	-
bS	-	-	-	-	-	-
Moz	10,8	8,1	11,6	17,6	32,1	46,5

Mitosen in %0

	M_K	M_Z		M_K	M_Z
rMI 24	$\frac{0}{64} = 0$	$\frac{0}{60} = 0$	rMI 72	$\frac{0}{13} = 0$	$\frac{0}{20} = 0$
wMI 24	$\frac{12}{1620} = 7,4$	$\frac{3}{1702} = 1,8$	wMI 72	$\frac{0}{1338} = 2,2$	$\frac{0}{896} = 0$
rMI 48	$\frac{0}{34} = 0$	$\frac{0}{40} = 0$			
wMI 48	$\frac{7}{1652} = 4,2$	$\frac{0}{1491} = 0$			

Zeichenerklärung siehe Tab. 1

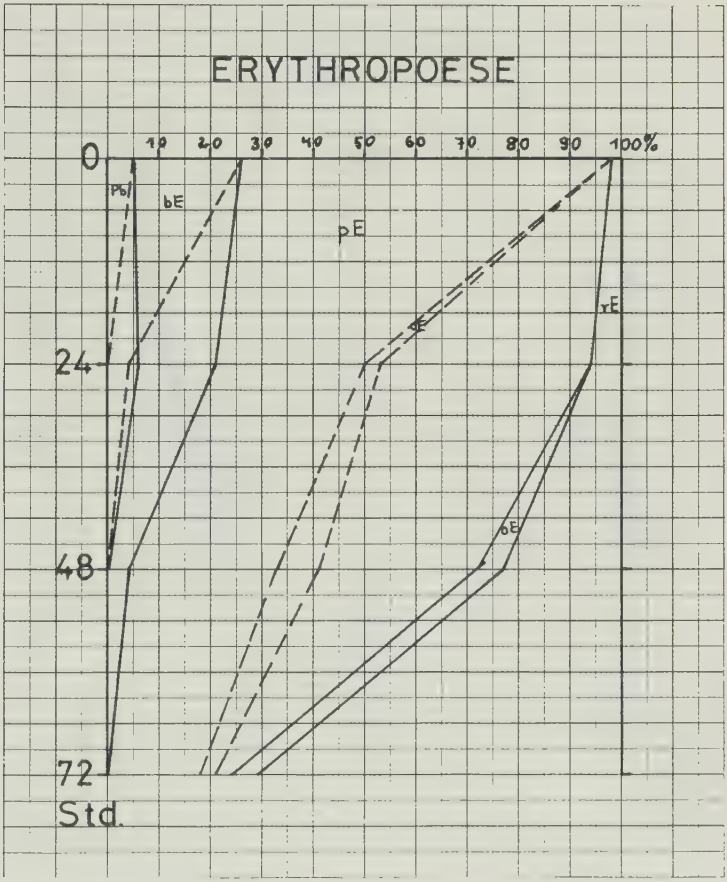


Abb. 5a Reifungskurven, Hildegard R.

Zusatz ---------- Kontrolle ——————

Zeichenerklärung siehe Abb. 1a und 1b

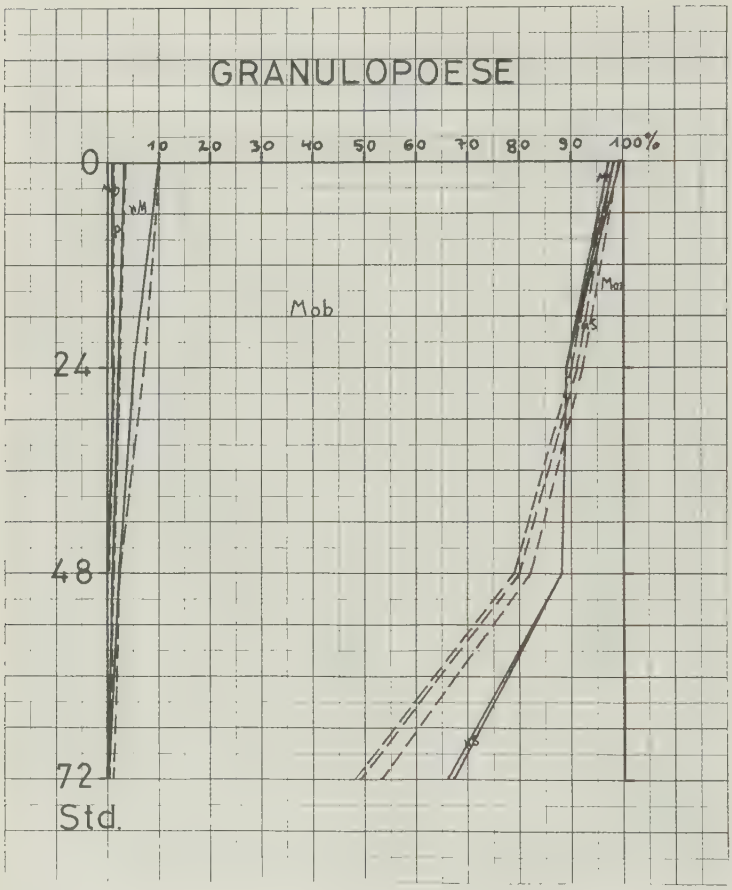


Abb. 5b Reifungskurven, Hildegard R.

Zusatz ---------- Kontrolle ——————

Zeichenerklärung siehe Abb. 1a und 1b

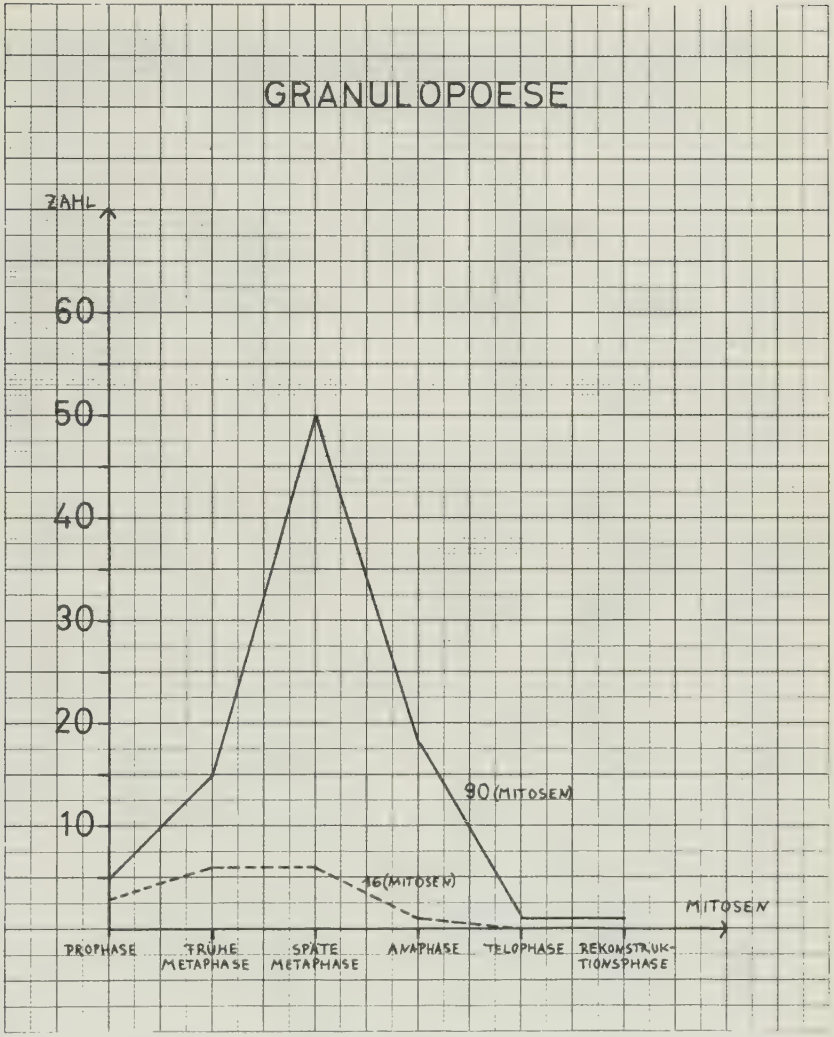


Abb. 6 Mitosenverteilung, absolute (s. Text auf S. 54)

Abszisse: Mitosephasen
Ordinate: absolute Mitosezahl

Tab. 6: Hier sind die Lymphozyten und Retikulumzellen aller Fälle in %o zur Gesamtzellzahl aufgetragen. Es soll gezeigt werden, inwieweit Chlorambucil auf diese Zelltypen in vitro wirkt.

Fall 1

	Lymphoz.		Retikulumz. (gr. u. kl.)	
	Oh : 38,1		Oh : 11,2	
	Kontrolle	Zusatz	Kontrolle	Zusatz
24 h	77,0	49,3	5,9	7,7
48 h	85,6	70,3	19,2	7,9
72 h	74,0	36,9	10,3	18,5

Fall 2

	Oh : 46,8		Oh : 33,1	
24 h	142,6	209,0	10,6	12,4
48 h	307,6	36,8	14,8	8,7
72 h	82,6	65,5	17,5	16,4

Fall 3

	Oh : 27,3		Oh : 7,3	
24 h	21,2	63,4	11,1	11,3
48 h	50,7	66,2	6,7	7,7
72 h	63,7	54,7	10,3	7,8

Fall 4

	Oh : 17,0		Oh : 15,5	
24 h	27,6	25,0	28,6	20,3
48 h	9,1	37,5	49,3	18,8

Fall 5

	Oh : 55,3		Oh : 15,5	
24 h	26,7	29,2	11,9	13,0
48 h	18,6	24,9	20,6	13,9
72 h	13,9	60,5	71,7	25,7

Tab. 7: zeigt einerseits die Mitose-Indices in ‰ und Absolut-Zahlen, andererseits die G/E-Indices aller Fälle.

	Fall		r.Mi.I	w.Mi.I	G/E I.			
	1	normal	14,1 ($\frac{6}{427}$)	7,7 ($\frac{5}{650}$)	3,98			
	2	normal	14,9 ($\frac{12}{803}$)	8,4 ($\frac{5}{594}$)	1,1			
0h	3	CML	19,7 ($\frac{4}{203}$)	10,5 ($\frac{10}{956}$)	9,26			
	4	CML	0 ($\frac{0}{23}$)	11,3 ($\frac{13}{1144}$)	55,4			
	5	AMoL	0 ($\frac{0}{74}$)	12,0 ($\frac{21}{1753}$)	23,9			
			K	Z	K	Z	K	Z
	1		3,9 ($\frac{1}{254}$)	0 ($\frac{0}{483}$)	2,8 ($\frac{3}{1076}$)	1,2 ($\frac{1}{804}$)	2,5	2,2
	2		9,6 ($\frac{3}{313}$)	0 ($\frac{0}{269}$)	12,7 ($\frac{12}{946}$)	3,1 ($\frac{2}{646}$)	1,9	2,0
24 h	3		17,6 ($\frac{3}{171}$)	0 ($\frac{0}{139}$)	10,1 ($\frac{8}{791}$)	2,1 ($\frac{2}{949}$)	10,4	9,8
	4		0 ($\frac{0}{7}$)	0 ($\frac{0}{6}$)	6,8 ($\frac{12}{1747}$)	1,7 ($\frac{3}{1739}$)	106,1	66,7
	5		0 ($\frac{0}{64}$)	0 ($\frac{0}{60}$)	7,4 ($\frac{12}{1620}$)	1,8 ($\frac{3}{1702}$)	26,8	16,5
	1		0 ($\frac{0}{177}$)	0 ($\frac{0}{129}$)	3,9 ($\frac{3}{760}$)	2,0 ($\frac{1}{500}$)	2,7	2,2
	2		6,5 ($\frac{1}{153}$)	0 ($\frac{0}{204}$)	8,5 ($\frac{4}{473}$)	1,7 ($\frac{1}{592}$)	1,5	1,6
48 h	3		2,4 ($\frac{1}{412}$)	0 ($\frac{0}{121}$)	4,6 ($\frac{4}{868}$)	1,4 ($\frac{1}{707}$)	1,9	6,8
	4		0 ($\frac{0}{2}$)	0 ($\frac{0}{3}$)	13,5 ($\frac{21}{1558}$)	1,9 ($\frac{2}{1054}$)	154,3	85,4
	5		0 ($\frac{0}{34}$)	0 ($\frac{0}{40}$)	4,2 ($\frac{7}{1652}$)	0 ($\frac{0}{1491}$)	42,6	19,4
	1		0 ($\frac{0}{111}$)	0 ($\frac{0}{32}$)	2,2 ($\frac{1}{464}$)	0 ($\frac{0}{340}$)	1,8	6,2
	2		4,3 ($\frac{1}{234}$)	0 ($\frac{0}{154}$)	2,4 ($\frac{2}{833}$)	0 ($\frac{0}{415}$)	0,84	0,5
72 h	3		0 ($\frac{0}{106}$)	0 ($\frac{0}{30}$)	2,7 ($\frac{3}{1118}$)	0 ($\frac{0}{388}$)	4,4	5,6
	4		-	-	-	-	-	-
	5		0 ($\frac{0}{13}$)	0 ($\frac{0}{20}$)	2,2 ($\frac{3}{1338}$)	0 ($\frac{0}{896}$)	44,5	19,2

Tab. 8a (s. Text S. 16 u. 56):
Werte der Signifikanzberechnung des Falles 2, Charlotte R. - Normales Knochenmark

Erythropoese

	B_K	E_K	$\frac{(B_K-E_K)}{E_K}$	B_Z	E_Z	$\frac{(B_Z-E_Z)}{E_Z}$
24 h						
Pb, bE, pE	223	224,82	0,01	218	216,18	0,02
oE	90	71,88	4,57	51	69,12	4,75
rE	286	302,30	0,88	307	290,70	0,91
48 h						
Pb, bE, pE	92	89,24	0,09	138	140,76	0,05
oE	61	49,28	2,79	66	77,72	1,77
rE	339	353,48	0,59	572	557,52	0,38

Bei einem Freiheitsgrad von 2 ergibt sich:

nach 24 h für χ^2 = 11,14, d. h. hoch signifikant
nach 48 h für χ^2 = 5,66 d. h. nicht signifikant

Zeichenerklärung s. Seite 16

Tab. 8b: Granulopoese

	B_K	E_K	$\frac{(B_K-E_K)}{E_K}$	B_Z	E_Z	$\frac{(B_Z-E_Z)}{E_Z}$
24 h						
Mb	17	16,44	0,02	16	16,56	0,02
P	234	220,13	0,87	208	221,86	0,87
nM	521	362,08	69,76	206	364,92	69,21
eM	14	13,94	-	14	14,05	-
MM	157	174,31	1,72	193	75,68	1,70
ST	25	33,37	2,10	42	33,63	2,08
nS	164	303,81	64,34	446	306,19	63,84
eS	13	20,92	3,00	29	21,08	2,97
48 h						
Mb	11	5,57	5,30	4	9,43	3,13
P	70	78,67	0,96	142	133,33	0,56
nM	250	225,63	2,63	358	382,37	1,55
eM	33	21,15	6,64	24	35,85	3,91
MM	103	61,23	28,49	62	103,77	16,81
ST	8	6,68	0,26	10	11,32	0,15
nS	229	303,19	18,15	588	513,81	10,71
eS	10	11,88	0,30	22	20,12	0,17

Bei einem Freiheitsgrad von 7 ergibt sich:

nach 24 h für χ^2 = 282,49, d. h. hoch signifikant
nach 48 h für χ^2 = 99,75, d. h. hoch signifikant

Zeichenerklärung s. S.16

Tab. 9a Werte der Signifikanzberechnung des Falles III, Hilde N. - Chronische myeloische Leukämie

	B_K	E_K	$\frac{(B_K-E_K)}{E_K}$	B_Z	E_Z	$\frac{(B_Z-E_Z)}{E_Z}$
			24 h			
Pb						
bE						
pE	171	150,50	2,97	139	159,50	2,63
oE						
rE	13	33,50	12,54	56	35,50	11,84
			48 h			
Pb						
bE	412	382,03	2,35	121	150,97	5,95
pE						
oE						
rE	251	280,97	3,20	141	111,03	8,09
			72 h			
Pb						
bE	106	72,17	15,85	30	63,83	17,93
pE						
oE	240	273,83	4,18	276	242,17	4,73
rE						

Bei einem Freiheitsgrad von 1 ergibt sich

nach 24 h für χ^2 = 29,84, d. h. hoch signifikant
nach 48 h für χ^2 = 19,59, d. h. hoch signifikant
nach 72 h für χ^2 = 42,69, d. h. hoch signifikant

Tab. 9b: Granulopoese

	B_K	E_K	$\frac{(B_K-E_K)}{E_K}$	B_Z	E_Z	$\frac{(B_Z-E_Z)}{E_Z}$
24 h						
Mb	96	64,13	15,83	32	63,86	15,90
P	263	222,97	7,19	182	222,03	7,22
nM	257	322,18	13,19	386	320,82	13,24
eM	28	41,09	4,17	54	40,91	4,19
MM	140	211,44	24,14	282	10,55	24,24
ST	57	78,66	5,97	100	78,33	5,99
nS	1011	886,37	17,52	758	882,63	17,60
eS	26	48,10	10,15	70	47,90	10,20
Moz	20	23,05	0,40	26	22,95	0,41
48 h						
Mb, P	287	192,68	46,18	169	263,32	33,79
nM	269	210,42	16,31	229	287,58	11,93
eM	132	108,17	5,25	124	147,83	3,84
MM	163	138,59	4,30	165	189,41	3,15
ST	60	43,94	5,87	44	60,06	4,29
nS	237	447,04	98,69	821	610,96	72,21
eS	45	53,66	1,40	82	73,34	1,02
Moz	12	7,61	2,54	6	10,39	1,86
72 h						
Mb, P	66	50,89	4,48	42	57,10	3,00
nM	626	391,13	141,03	204	438,86	125,69
eM	118	95,19	5,47	84	106,81	4,87
MM	306	171,06	106,44	57	191,94	94,86
ST	40	35,81	0,49	36	40,18	0,44
nS	318	702,63	210,55	1173	788,37	187,65
eS	34	62,67	13,12	99	70,32	11,69
Moz	8	6,00	0,30	6	7,40	0,27

Bei einem Freiheitsgrad von 7 (bei 24 h von 8) ergibt sich:

nach 24 h für χ^2 = 197,55, d. h. hoch signifikant
nach 48 h für χ^2 = 312,62, d. h. hoch signifikant
nach 72 h für χ^2 = 911,35, d. h. hoch signifikant

Tab. 10: Megakariozyten der Fälle 3 und 4, beide CML (s. S. 55) in ‰ zur Gesamtzellzahl

Fall	24 h		48 h		72 h	
	K	Z	K	Z	K	Z
3	0,9	14,8	29,7	10,8	10,8	19,2
4	24,3	0,52	3,0	21,9	-	-

Zusammenstellung der Ergebnisse

1. Bei allen fünf Versuchen zeigt sich eine einheitliche Wirkung von 20 y/ml Chlorambucil auf die Mitose-Indices des Knochenmarkes, nämlich eine deutliche Hemmung der Mitosen sowohl in der Granulo- als auch der Erythropoese. Die Wirkung ist offensichtlich unabhängig, ob es sich um normales oder leukämisches Knochenmark handelt.

2. Auch in den fünf Reifungskurven der Erythropoese zeigt sich eine deutliche Tendenz in Form einer Linksverschiebung, also eine Abnahme der teilungsfähigen Vorstufen und eine relative Zunahme der reifen Formen. Die Wirkung des Chlorambucil besteht bei der Erythropoese also in einer Störung der Regeneration mit gleichzeitiger scheinbarer Förderung der Reifung.

3. Bei der Granulopoese zeigen die Reifungskurven nach 24 h kein einheitliches Bild.

   Bei den Versuchen mit normalem Knochenmark (Fall 1 u. 2) findet sich eine Linksverschiebung, während man bei den Fällen von chronischer Myelose (Fall 3 u. 4) eher von einer Rechtsverschiebung reden kann. Die Ursache liegt hier wohl in einer veränderten Proliferationskinetik des leukämischen Knochenmarkes.

   Nach 48 und 72 h sind die Verhältnisse dann einheitlich. In allen fünf Fällen überwiegen die reifen Formen. Diese Wirkung des Chlorambucil ist wie bei der Erythropoese mit einer Hemmung der Regeneration, damit Verminderung der teilungsfähigen Zellen und einer scheinbaren Förderung der Reifung zu erklären.

4. Die Wirkung auf den G/E-Index ist unterschiedlich (Tab. 7). Bei den Versuchen mit normalem Knochenmark (Fall 1 u. 2) ist kein wesentlicher Unterschied durch den Zusatz festzu-

stellen. Bei der ausgeprägten chronischen Myelose (Fall 4) und der akuten Monoblastenleukämie (Fall 5) sinkt der G/E-Index, offensichtlich durch stärkere Zerstörung der Leukämischen Zellen. Nur bei der beginnenden chronischen Myelose (Fall 3) sind die Verhältnisse uneinheitlich.

5. Die Wirkung auf die Lymphozyten und Retikulumzellen stellt die Tabelle 6 dar.

   Bei den Versuchen 1 und 2 mit normalem Knochenmark zeigt sich eine deutliche Verminderung der Lymphozyten unter Zusatz von Chlorambucil. Bei den Kulturen mit myeloischem leukämischem Knochenmark (Fall 3 u. 4) ist eine lymphozytäre Depression zweifelhaft.

   In bezug auf die Retikulumzellen fällt auf, daß besonders - mit Ausnahme des Falles 3 - nach 48 h eine Verminderung der Retikulumzellen zu verzeichnen ist.

6. Nur die karyologische Kurve der Granulopoese ist auswertbar, da die der Erythropoese aufgrund nur weniger Mitosen (ohne Zusatz 10, mit Zusatz keine) nicht darstellbar war (Abb. 6). Im Vordergrund steht die Verminderung aller Mitosephasen, besonders aber der späten Meta- und Anaphase. Telo- und Rekonstruktionsphase kamen bei Zusatz von Chlorambucil gar nicht mehr vor.

   Die Frage, ob Chlorambucil die Mitosen einer bestimmten Reifungsstufe hemmt, muß bei diesen Versuchen verneint werden. Die Wirkung erfaßt offensichtlich alle teilungsfähigen Reifungsstufen.

7. Die Megakaryozyten wurden bei den Versuchen mit chronisch myeloischem Knochenmark (Fall 3 u. 4) in der Tabelle 10 festgehalten, da ELSON bei Ratten (s. S. 9) eine vermehrte Resistenz der Megakaryozyten gegenüber Chlorambucil feststellte. Es überwiegen im Fall 3 die Megakaryozyten bei Zusatz von Chlorambucil nach 72 h und im Fall 4 nach

48 h, jedoch sind wiederum bei Fall 3 die Verhältnisse nach 48 h umgekehrt, so daß sich keine einheitliche Tendenz erkennen läßt.

8. Signifikanzberechnung (s. Tab. 8a, 8b, 9a, 9b u. S.16) Die Fälle 2 und 3 wurden nach dem χ^2-Verfahren auf Signifikanz berechnet. Bei dem Fall 2 handelte es sich um normales Knochenmark, beim Fall 3 um chronisch myeloisches. Der Fall 2 wurde bei 24 und 48 h berechnet, da die 72 h-Kontrollpräparate wegen technischen Fehlers nicht auswertbar waren. Ferner gingen in der Granulopoese die Werte für die basophilen Myelozyten, Monoblasten, basophilen Segmentkernigen und Monozyten wegen zu geringer Anzahl nicht in die Berechnung ein. In der Erythropoese wurden aus demselben Grund die Proerythroblasten, basophilen Erythroblasten und polychromatischen E. zusammengefaßt.

Ergebnisse (Fall 2):
Erythropoese (Freiheitsgrad v. 2)
24 h χ^2 = 11,14, d. h. signifikant
48 h χ^2 = 5,66, d. h. nicht signifikant

Granulopoese (Freiheitsgrad v. 7)
24 h χ^2 = 282,49, d. h. hoch signifikant
48 h χ^2 = 99,75, d. h. hoch signifikant

Beim Fall 3 wurden in der Granulopoese wegen geringer Zellzahlen die basophilen Myelozyten, Monoblasten und basophilen Segmentkernigen nicht in die Rechnung mit einbezogen. In der Erythropoese wurden aus dem gleichen Grund die teilungsfähigen Formen (Pb, bE, pE, oE) den reifen Erythrozyten gegenübergestellt.

Ergebnisse (Fall 3):

Erythropoese (Freiheitsgrad v. 1)

24 h χ^2 = 29,81, d. h. hoch signifikant
48 h χ^2 = 19,59, d. h. hoch signifikant
72 h χ^2 = 42,69, d. h. hoch signifikant

Granulopoese (Freiheitsgrad v. 7, bei 24 h v. 8)

24 h χ^2 = 197,55, d. h. hoch signifikant
48 h χ^2 = 312,62, d. h. hoch signifikant
72 h χ^2 = 911,35, d. h. hoch signifikant

Die Berechnung ergibt für den Fall 3 durchweg hohe Signifikanz der Werte von 24 bis 72 h. Signifikant sind beim Fall 2 nur die 24 h-Werte. Aufgrund der unterschiedlichen Proliferationskinetik von normalem und leukämischem Knochenmark ist hier ein Vergleich von zweifelhafter Aussagekraft.

Diskussion

Im Vordergrund steht bei der Betrachtung der Proliferationskinetik die mitosehemmende Wirkung von Chlorambucil. Diese ist unabhängig von der Zellart, da sie sowohl die Granulo- und Erythropoese als auch die Monopoese betrifft. Gleichartige Ergebnisse erzielte auch ELSON mit seinen Untersuchungen bei Ratten (5). Die Wirkung ist ferner unabhängig davon, ob es sich um leukämische oder nichtleukämische Zellen handelt. Ebenso wie bei ELSON waren auch in unseren Versuchen pathologische Mitosen auffällig, doch nicht so zahlreich, wie er sie beschrieb, was vermutlich eine Frage der Dosierung ist. Offensichtlich schädigt Chlorambucil die Zellen in der prämitotischen Phase, vielleicht auch während der Teilung selbst, da besonders die späte Meta- und die Anaphase kaum noch vorkommen. Es schädigt die in der Mitose befindlichen Zellen derart, daß sie degenerieren und zugrunde gehen. Würde Chlorambucil eine Arretierung in bestimmten Mitosephasen verursachen, so müßte eine Zunahme der Mitosen in den entsprechenden Phasen vorliegen (3). Der mitosehemmende Effekt betrifft alle teilungsfähigen Reifungsstufen.

Die Linksverschiebung der Reifungskurven in der Erythropoese durch Chlorambucil ist mit einer Hemmung der Regeneration und Verminderung der teilungsfähigen Zellen zu deuten. Wie in der Erythropoese hemmt Chlorambucil auch in der Granulopoese die Regeneration und vermindert die teilungsfähigen Formen, wie die Reifungskurven zeigen.

Die starke Zunahme der Segmentkernigen nach 48 und 72 h ebenso wie die der reifen Erythroblasten läßt sich mit einer zusätzlichen verstärkten Reifungsförderung erklären. Die reifungsfördernde ebenso wie die regenerationshemmende Wirkung des Chlorambucil betrifft die normale wie die leukämische und die monoblastische Granulopoese.

ELSON fand bei seinen Untersuchungen mit Ratten ebenfalls bis 48 h eine relative Vermehrung der reifen Formen der Erythro- und Granulopoese, jedoch trat danach wieder eine schnelle Regeneration der Zellen auf. Beim humanen Knochenmark war die regenerationshemmende Wirkung nach 72 h noch nicht aufgehoben. Hier hat Chlorambucil offensichtlich einen länger anhaltenden Effekt als auf das Knochenmark der Ratte. Wann beim humanen Knochenmark wieder eine Regeneration eintritt, läßt sich durch unsere Versuchsanordnung mit Bebrütungszeiten bis 72 h nicht klären.

Wie bei ELSON war auch bei uns eine Übersegmentierung der segmentkernigen Granulozyten und das Auftreten von Gänseblümchenkernen bei den reifen Erythroblasten auffällig. Zusätzlich traten abnorme Kernformen und Vakuolisierung des Plasmas besonders in den unreifen Formen der Granulopoese auf. Die Ursache hierfür scheint eine direkte toxische Wirkung durch Chlorambucil zu sein.

Die Wirkung auf die Lymphozyten festzustellen, war aufgrund bisheriger Untersuchungen und Ergebnisse naheliegend. Die beschriebene Depression der Lymphozyten bei lymphatischer Leukämie (9, 10, 7) läßt sich von uns nur teilweise bestätigen. LAWLER (13) untersuchte die Wirkung von Chlorambucil auf die Blutlymphozyten. Er stellte fest, daß die Lymphozyten mal resistent, mal empfindlich waren, unabhängig davon, ob es sich um normales oder leukämisches Blut handelte. Die Ursache der unterschiedlichen Wirkung von Chlorambucil auf die Lymphozyten ist bisher unbekannt.

Die Retikulumzellen scheinen gegenüber Chlorambucil ebenfalls eine gewisse Empfindlichkeit zu haben, was sich in einer Verminderung ihrer Zellzahl besonders nach 48 h ausdrückt.

ELSON fand bei seinen Versuchen mit Ratten eine deutliche Resistenz der Megakaryozyten gegenüber Chlorambucil. Ein ähnlicher Effekt scheint bei 2 chronischen Myelosen in unserem

Untersuchungsgut vorzuliegen in Form einer allerdings uneinheitlichen Vermehrung bei längerer Bebrütungszeit. Jedoch sind gezieltere Untersuchungen notwendig, um dies zu untermauern.

Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollte die Art und Weise der Wirkung des Zytostatikums Chlorambucil auf die Proliferation des Knochenmarks in vitro untersucht werden. Es wurden fünf Knochenmarkkulturen von fünf verschiedenen Patienten mit und ohne Zusatz von 20 y/ml Chlorambucil bis zu 72 h incubiert (zweimal normales Knochenmark, zwei chronische Myelosen und eine Monoblastenleukämie). Die mittels Differenzierung der Zellen gefundenen Ergebnisse wurden anhand von Reifungs- und karyologischen Kurven, G/E- und Mitoseindices veranschaulicht. Zusätzlich wurden zwei Fälle statistisch auf Signifikanz berechnet sowie die Wirkung auf die Lymphozyten und Retikulumzellen beobachtet.

Die Hauptwirkung des Chlorambucil liegt in der Verhinderung von Mitosen, unabhängig, ob normales oder leukämisches Knochenmark vorliegt. Es schädigt die Zellen besonders in der praemitotischen Phase womöglich auch während der Mitose selbst. Die mitosehemmende Wirkung ist nicht auf bestimmte Reifungsstufen beschränkt, sondern umfaßt alle teilungsfähigen Formen. Eine Reifungsförderung auf die Erythro- und Granulopoese kann als ein sekundärer Effekt auf die verhinderte Zellmultiplikation gedeutet werden. Die Lymphopoese konnte nicht sicher beurteilt werden.

Literaturverzeichnis

(1) BARANOW, L. von: Grundbegriffe moderner statistischer Methodik (Hirzel, Stuttgart 1950)

(2) BELITZ, H.J.: Der Mathematikunterricht. Sonderdruck Heft 3/60 (Klett, Stuttgart 1960)

(3) BOLL, I.: Granulozytopoese unter physiologischen und pathologischen Bedingungen (Springer, Berlin-Heidelberg-New York 1966)

(4) BOLL, I. u. G. MERSCH: Morphologische Untersuchungen zur Proliferationskinetik der normalen und pathologischen Erythropoese in vitro. Blut 17, 193 (1968)

(5) ELSON, L.A.: The action of chlorambucil (CB 1348) and busulphan (Myleran) on the haemopoetic organs of the rat. Brit. J. Haematol, 4, 355 (1958)

(6) EVERETT, J.L., J.R. ROBERTS u. W.C.J. ROSS: Aryl-2-halogenoalkylamines. Part XII. Some carboxylic derivatives of N, N-di-2-chlorethylaniline. J. chem. Soc., 2386 (1953)

(7) EZDINLI, E.Z. u. L. STUTZMAN: Chlorambucil therapy for lymphomas and chronic lymphatic leukaemia. J. Amer. Med. Ass., 191, 444 (1965)

(8) FRECKMANN, H.A., H.L. FRY, F.L. MENDEZ u. E.R. MAURER: Chlorambucil - Prednisolone therapy for disseminated breast carcinoma. J. Amer. Med. Ass. 189, 23 (1964)

(9) GALTON, D.A.G., L. G. ISRAELS, J.D.N. NABARRO u. M. TILL: Clinical trials of p-(Di-2-chloroethylamino)-phenylbutyric acid (CB 1348) in malignant lymphoma. Brit. Med. J. 2, 1172 (1955)

(10) GALTON, D.A.G., E. WILTSHAW, L. SZUR u. J.V. DACIE: The use of chlorambucil and steroids in the treatment of chronic lymphatic leukaemia. Brit. J. Haemat, 7, 73 (1961)

(11) HADDOW, A.: New cytotoxic and radiomimetic agences Annuel Report Brit. Emp. Cancer Campaign, 30, 25 (1952)

(12) KARLSON, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie (Thieme, Stuttgart 1967)

(13) LAWLER, S.D., K.D. LELE, C.R. PENTYCROSS: A simple in vitro test for assessing the sensivity of lymphocytes to chlorambucil. Brit. J. Cancer 25, 493 (1971)

(14) LINDER, A.: Statistische Methoden (Birkhäuser, Basel 1960)

(15) MASTERSON, J.G., R.J. CALAME u. J. NELSON: A clinical study on the use of chlorambucil in the treatment of cancer of the ovary. Amer. J. Obstetr. Gynec. 79, 1002 (1960)

(16) MOESCHLIN S.: Fortschritte der Hämatologie. Schweiz. med. Wschr. 90, 1117 (1960)

(17) - Zeitgemäße Behandlung der Leukosen. Schweiz. med. Wschr. 95, 221 (1965)

(18) MÜLLER-SEIFERT: Taschenbuch der medizinisch-klinischen Diagnostik. 69. Auflage (Bergmann, München 1966)

(19) PUTTEN, L.M. van P. LELIEVELD u. L.K.J. KRAM-IDSENGA: Cell proliferation dependence of chemotherapeutic effects on tumors. Annuel Report, REP, 62 (1971)

(19) ROHR, K.: Das menschliche Knochenmark (Thieme, Stuttgart 1960)

(20) Wissenschaftliche Tabellen: J.R. Geigy A.G., Basel (1968)

(21) WITTE, S.: Über den heutigen Stand der Chemotherapie maligner Tumoren. Fortschr. d. Med., 86, 58 (1968)

(22) WOLFSON, S. u. OLNEY, B. MARY: Accidental ingestion of a toxic dose of chlorambucil. Report of a case in a child. J. Amer. Med. Ass. 165, 238 (1957)

Studie im Rahmen der Assoziation Haematologie

EURATOM - GSF, Nr. 031-64-1 BIAD

Die Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft unterstützt.

Mein besonderer Dank gilt Frau Professor Dr. med. Irene Boll für die Überlassung des Themas und die ständige Beratung und Unterstützung.

Für die Überprüfung der Signifikanzberechnung danke ich auch Herrn Professor Dr. H. J. Belitz.

Lebenslauf

Als Sohn des praktischen Arztes Dr. Horst Baenisch und dessen Ehefrau Ingeborg, geb. Scholle, bin ich, Klaus Kurt Arthur Baenisch, am 14. 12. 1947 in Lockstedter-Lager in Schleswig-Holstein geboren.

1952 zogen wir nach Berlin, wo mein Vater eine Praxis in Waidmannslust (Reinickendorf) übernahm. Ostern 1954 wurde ich in die 19. Grundschule eingeschult. Nach Absolvierung der sechs Grundschuljahre ging ich 1960 auf die Vereinigte Georg Herwegh und Hans Thomas-Schule in Hermsdorf und bestand dort 1967 mein Abitur.

Seit dem Sommersemester 1967 studierte ich an der FU Berlin Medizin und machte im Frühjahr 1970 mein Physikum.

Am 27. 7. 1973 bestand ich die ärztliche Prüfung.